УДК 577.115:[577.152.9+612.127
© Клімочкина О.М., Сухоставська Н.О., 2012

ПРОДУКЦІЯ СТАБІЛЬНИХ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ ТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В УМОВАХ РІЗНОГО СТАНУ ОПІАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ В КЛІТИНАХ З ІНДУКОВАНИМ АПОПТОЗОМ

Клімочкина О.М., Сухоставська Н.О.

Луганський національний університет імені Тараса Шевченка

Вступ. Важливу роль в організмі в цілому і у функціонуванні кожної клітини окремо відіграє оксид азоту (NO) - одна з ключових сигнальних молекул, які регулюють функції серцево-судинної, нервової та імунної систем організму [4]. Слід відзначити, що на продукцію NO впливають багато факторів, зокрема, гормони, цитокіни, тканина гіпоксія і інші [2]. Крім того, оксид азоту здатний двояко впливати на процеси програмованої клітинної загибелі: в одних випадках викликати апоптоз, в інших захищати клітини від апоптозу. Перший ефект обумовлений його властивостями як оксиданту, патогенетичну основу токсичної дії становить реакція його з супероксид - аніон - радикалом, в результаті чого утворюється пероксинітрит. Цитотоксичний потенціал пероксинітриту включає інактивацію метаболічних шляхів, пошкодження клітинних структур, білка, мутацію ДНК, стимуляцію апоптозу [9]. Інший ефект виникає в клітинах, які мають систему гуанілатциклаза – циклічний гуанілатмонофосфат . Як доведено, мононуклеарні клітини в своєму складі містять три ізоформи NO - синтази і здатні до синтезу оксиду азоту [2]. У свою чергу, вторинними месенджерами багатьох процесів є цераміди, так зокрема, вони розглядаються як проапоптотичні фактори у багатьох клітинах. Проте незрозуміло яким чином цераміди можуть впливати на вироблення оксиду азоту при змінному стані опіатних рецепторів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами: робота виконувалася в рамках наукової програми Міністерства освіти та науки, молоді та спорту України "Дослідження процесів проліферації та диференціювання мезенхімальних стволових клітин та їх вплив на регенерацію тканин» (№ державної реєстрації 0111U002247).

Метою роботи було визначення продукції стабільних метаболітів оксиду азоту при активації і блокаді опіатних рецепторів у мононуклеарних клітинах здорових донорів при індукції апоптозу і виявлення зв'язку з нею активності супероксиддисмутази.

Матеріали та методи дослідження. Для дослідження брали мононуклеарні клітини, виділені з периферичної крові здорових донорів. Культуру мононуклеарних клітин (МНК) отримували з гепарінізованої венозної крові на градієнті щільності фіколл-верографіну . Клітини культивували в середовищі Ігла МЕМ з додаванням ембріональної телячої сироватки, L - глутаміну та антибіотиків. Клітини культивували 24 і 48 годин. Життєздатність клітин в культурі визначали по тесту з тріпановим синім. У експеримент були взяті 7 дослідних груп: у першій групі клітини культивували з C_6 - церамідом (аналогом проникного для клітини цераміду, Sigma), у другий - з C_6 - церамідом і дексаметазоном (Sigma). У третю спочатку вносили C_6 - церамід, а потім неселективний агоніст опіатних рецепторів - даларгін (синтетичний лей-енкефалін [D-Ala 2 ,Lue 5,Arg 6] - енкефалін, ЗАТ "БІОЛІК", м. Харків), у четверту до C_6 - цераміду та даларгіну додавали дексаметазон. У п'ятій клітини культивували з C_6 - церамідом і селективним агоністом μ – опіатних рецепторів DAGO (10-6М), у шосту - до C_6 - цераміду додавали DAGO і дексаметазон з інтервалом в 5 хвилин. У сьому вносили C_6 - цераміди і блокатор опіатних рецепторів налаксон (solutionNaloxoni-M 0,4 мг в 1мл, ЗАТ "БІОЛІК", м. Харків). Контролем служила інтактна культура мононуклеарних клітин з 24 і 48 часовою інкубацією.

Для визначення концентрації нітритів використовували реактив Грісса, для визначення нітратів проводили їх попереднє відновлення цинковим пилом [9]. Оптичну густину визначали при довжині хвилі λ=540, результат розраховували за кривою з використанням стандартних розчинів нітриту натрію та нітрату калію. Активність СОД визначали за методом, який базується на здатності цього ферменту інгібувати аутоокислення адреналіну з максимумом поглинання в області 347 нм.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили на персональному комп'ютері з застосуванням стандартних пакетів прикладних програм .

Результати та їх обговорення. При аналізі отриманих даних ми мали максимальну продукцію нітрит – аніонів в першу добу культивування в групі дії цераміду при неселективній стимуляції опіатних рецепторів на 50% по відношенню до контролю (таблиця 1).

Таблиця 1. Кількість NO2- в культурі МНК здорових донорів при дії С6 - цераміду (С6) в умовах блокади і активації опіатних рецепторів (нмоль/мл на 2 × 106 клітин).

Показники	24 години	48 годин
Контроль	21,3 ± 4,9	26,3 ± 3,2
МНК + C_6	31,4± 1,2*	25,6± 2,7
МНК + C_6 + дексаметазон	28,3 ± 1,1*	21,1 ± 5,3
МНК + C_6 + даларгін	42,5±2,2*	34,3±1,7*
МНК + C_6 + даларгін+ дексаметазон	28,8±1,8*	24,5±2,7
МНК + C_6 + DAGO	36,4±2,2*	49,5±3,7*
МНК + C_6 + DAGO + дексаметазон	32,6± 1,4*	31,7± 1,9*
МНК + C_6 + налаксон	27,1± 1,9*	29,9± 0,9*

- $p < 0,05$, різниці показників достовірні порівняно з контролем.

В той час, як дія C_6 - цераміду в умовах вибіркової активації μ – опіатних рецепторів збільшувала кількість NO_2- на 41,4% ($p < 0,05$). Однак ситуація змінилася на другу добу: з плином часу акти-

вуюча дія C_6 - цераміду при селективної стимуляції рецепторів зростала, як в межах дослідної групи, так і по відношенню до контролю (на 26,5% і 47,1% відповідно ($p < 0,05$)). Як відомо, дексаметазон блокує активність NO - синтази та знижує продукцію оксиду азоту [11,12]. Однак, як ми спостерігаємо, інгібуючу дію гормону практично повністю знято церамідом і концентрація NO_2- на початку експерименту вище контрольних значень. Але додаткова стимуляція опіатних рецепторів, в даному випадку, призводить до деякого гальмування синтезу NO_2^-.

Дослідження нітрат - аніону (NO_3-) показали досить цікаву картину, що трохи відрізняється від продукції нітрит - аніонів. Так, при дії цераміду на клітини в них у перші години збільшувалася продукція NO_3- на 13,5% ($p < 0,05$), а з плином часу падала в межах групи на 26,1% ($p < 0,05$) і була значно нижче контролю (таблиця 2). Тоді як додаткове введення дексаметазону в межах дослідної групи з плином часу стимулювало вироблення нітрат - аніонів.

Таблиця 2. Кількість NO3- в культурі МНК здорових донорів при дії С6 - цераміду (С6) в умовах блокади і активації опіатних рецепторів (нмоль/мл на 2 × 106 клітин)

Показники	24 години	48 години
Контроль	356,1 ±24	395,4 ±60
МНК + C_6	411,5± 16,7 *	304± 8,7 *
МНК + C_6 + дексаметазон	305,6 ±46	520,7 ± 56 *
МНК + C_6 + даларгін	602,1 ± 38,1*	813,2 ± 37,4*
МНК + C_6 + даларгін+ дексаметазон	512,9 ± 18,7 *	756,1 ± 38,4 *
МНК + C_6 + DAGO	746,8 ±21 *	1109,2 ±31 *
МНК + C_6 + DAGO + дексаметазон	349,7±14	591,8±25 *
МНК + C_6 + налаксон	362,1±11	298,9±14*

* - $p < 0,05$, різниці показників достовірні порівняно з контролем.

У дослідних групах зі стимулюванням опіатних рецепторів ми спостерігали плавне підвищення змісту NO_3- з плином часу, що досягало свого максимуму в п'ятій дослідній групі і склало 64,3% по відношенню до контролю і 32,7% у межах групи ($p < 0,05$). Блокада ж опіатних рецепторів налаксоном призводила до гальмування синтезу NO_3- з плином часу і досягала мінімальних значень в усіх дослідних групах, хоча в першу добу достовірно не відрізнялася від значень контрольної групи. Отримані дані дозволяють припустити, що механізм дії церамідів на продукцію стабільних метаболітів оксиду азоту неоднозначний і тісно пов'язаний зі станом опіатних рецепторів.

В умовах нормальної життєдіяльності клітини утворюється строго впорядкована та регульована антиоксидантною системою кількість активних форм кисню (АФК), які необхідні для нормального функціонування клітин. При цьому, одним з основних показників стану цієї системи є активність супероксиддисмутази. Культивування МНК супроводжувалося збільшенням активності ферменту на другу добу. При дослідженні активності СОД у різних дослідних групах спостерігалися досить цікаві результати, які залежали від тривалості експерименту. Так, на першу добу культивування мононуклеарних клітин в стандартних умовах відбувалося максимальне збільшення активності СОД у першій і четвертій дослідних групах, яка наближалася до контрольних значень (таблиця 3).

Таблиця 3. Кількість СОД в культурі МНК здорових донорів при дії С6 - цераміду (С6) в умовах блокади і активації опіатних рецепторів (% інгібування на 2 млн клітин)

Показники	24 години	48 години
Контроль	66,9 ± 0,1	81,6 ± 0,4
МНК + C_6	63,4 ± 2,3	62,5 ± 8,1*
МНК + C_6 + дексаметазон	30 ± 2,9*	45 ± 3,4*
МНК + C_6 + даларгін	56,6 ± 3,6*	21,1 ± 4,1*
МНК + C_6 + даларгін+ дексаметазон	65 ± 3,1	52,5 ± 1,4**
МНК + C_6 + DAGO	29,5 ± 1,1**	58,4 ± 3,7**
МНК + C_6 + DAGO + дексаметазон	37,8 ± 1,7*	60,9 ± 1,3*
МНК + C_6 + налаксон	52,5 ± 2,4*	55,1 ± 3,1*

* $p < 0,05$, різниця показників достовірна порівняно з контролем; ** - $p < 0,05$, різниця показників достовірна порівняно з групою С6 – цераміду.

C_6 - цераміди підтримували активність ферменту на одному рівні протягом усього часу експерименту, то додаткове введення даларгіну знижувало активність як в межах групи, так і по відношенню до контролю на 62,9% і 65,9% відповідно ($p < 0,05$). В той час, як застосування селективної стимуляції рецепторів вже в першу добу викликало різке зниження активності цього ферменту, яка, втім, до кінця експерименту підвищувалася і практично наблизилась до контрольних значень.

Вочевидь, зниження активності ферменту в різні терміни культивування під впливом цераміду в умовах стимуляції опіатних рецепторів, можна пояснити тим, що швидкість реакції NO супероксидом вище, ніж супероксиддисмутазою і йде конкуренція за його нейтралізацію. Таке припущення корелює з продукцією оксиду азоту в нашому експерименті.

Висновки:

1. Дія C_6 - цераміду на продукцію стабільних метаболітів оксиду азоту двояко і безпосередньо пов'язане з опіатними рецепторами.
2. C_6 – церамід стимулює активність СОД і підтримує її на високому рівні протягом усього експерименту, що дозволяє припустити його цитопротекторну дію.
3. Вплив C_6 - цераміду на активність СОД в умовах активації опіатних рецепторів тісно пов'язаний з продукцією оксиду азоту.
4. Результати роботи дозволяють розширити розуміння комплексної регуляції апоптозу клітин різного рівня диференціювання і дозволяють оцінити можливість застосування агоністів опіатних рецепторів для підвищення виживання МСК при трансплантації, а також для терапії захворювань, пов'язаних з порушенням регуляції апоптозу імунної системи.

ЛІТЕРАТУРА:

1. **Дубиков А.И.** Ревматоидный артрит, апоптоз, оксид азота: новые аспекты патогенеза/ А.И. Дубиков.– Владивосток: Издательство Дальневост. ун-та,- 2004. – с.197
2. **Звягина Т.В.** Метаболиты оксида азота в крови и моче здоровых людей: их связь с цитокинами и гормонами/ Т.В. Звягина // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2002. – Том 3. - №2. – С. 302 – 304
3. **Командресова Т.М.** Влияние блокады опиатных рецепторов на стрессобусловленные изменения периферического сосудистого тонуса / Т.М. Командресова, С.Н. Курицын, А.В. Хромова // Биология – наука XXI века: тез. докл. 9-й Междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых. – Пущино, 2005. – С. 150.
4. **Кузьмичева Л.В.** Влияние оксида азота на апоптоз лимфоцитов / Кузьмичева Л.В., Костычева К.М. // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 2 – С. 132-132
5. **Москалева Е.Ю.** Возможные механизмы адаптации клетки к повреждениям, индуцирующим программированную гибель. Связь с патологией / Е.Ю. Москалева, С.Е. Северин // Патологическая физиология. – 2006. - №2. – С. 2-16.
6. Патент на корисну модель 24577 Україна, МПК C12N 5/08 G01N 33/49. Спосіб визначення вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту в культурі клітин / Комаревцева І.О.; заявники та власники патенту **Комаревцева І.О., Клімочкіна О.М., Андронова М.Є., Шипілова І.В.** - № u 200700413; заявл. 16.01.07; опубл. 10.07.07, Бюл. № 10.
7. **Фильченков А.А.** Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций/ А.А. Фильченков // Биохимия. – 2003. – Т. 68, №4. – С. 453-466.
8. **Череповский А.В.** Роль оксида азота в патогенезе остеоартроза: современные представления/ А.В. Череповский, С.В. Никулин , А.И. Дубиков // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2005. - №1. – С. 3 – 7.
9. **Юдин А.А.** Субпопуляционный состав и чувствительность к активационному апоптозу Т-лимфоцитов периферической крови на различных стадиях атерогенеза / А.А. Юдин, Л.В. Ковальчук, С.П. Григорьев и др. // Вестник РГМУ. – 2006. - №3. – С. 72-78.
10. **Binetruy B.** Concise review: Regulation of embryonic stem cell lineage commitment by mitogen-activated protein kinases/ B. Binetruy, L. Heasley, F. Bost et.al // Stem Cells. - 2007. – Vol.25. - P.1090–1095.
11. **Eisch A.J.** Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus/ A.J. Eisch, M. Barrot, C.A. Schad et.al // Proc .Nat .Acad .Sci USA.- 2000. - Vol.97.-P. 79–84.
12. **Hahn Jason W.** Mu and kappa opioids modulate mouse embryonic sten cell derived neural progenitor differentiation via map kinases / Jason W. Hahn, Shana Jagwani, Eunhae Kim et.al // J Neurochem. 2010 March.- 112(6).- P.1431–1441.
13. **Kim E.** Mu and kappa opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors/ E. Kim, A.L. Clark , A. Kiss et.al //J Biol Chem.- 2006.- Vol.281.- P. 60-74.
14. **Matsunaga Toshiyuki.** Ceramid- induced intracellular oxidant formation, iron signaling and apoptosis in endothelial cells/ Toshiyuki Matsunaga, Joy Joseph. // J. Biol. Chem. – 2004. - Vol. 279. – P. 28614-28624.
15. **Tuteja N.** Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology / N. Tuteja, M. Chandra, R. Tuteja et.al // J Biomed Biotechnol.- 2004.- N4.-P. 227-237

Клімочкина О.М., Сухоставська Н.О. Продукція стабільних метаболітів оксиду азоту та супероксиддисмутази в умовах різного стану опіатних рецепторів в клітинах з індукованим апоптозом // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 86-88.

Метою роботи було визначення продукції стабільних метаболітів оксиду азоту при активації і блокаді опіатних рецепторів у мононуклеарних клітинах здорових донорів при індукції апоптозу і виявлення зв'язку з нею активності супероксиддисмутази. Результатами роботи є: дія C_6 - цераміду на продукцію стабільних метаболітів оксиду азоту двояко і безпосередньо пов'язане з опіатними рецепторами. Експеримент також показав, що вплив C_6 - цераміду на активність СОД в умовах активації опіатних рецепторів тісно пов'язаний з продукцією оксиду азоту,а також C_6 – церамід стимулює активність СОД і підтримує її на високому рівні протягом усього експерименту, що дозволяє припустити його цитопротекторну дію.

Ключові слова: оксид азота, апоптоз, опіатні рецептори, супероксиддисмутаза

Климочкина О.М., Сухоставская Н.О. Продукция стабильных метаболітів оксида азота и супероксиддисмутази в условиях разного состояния опіатних рецепторов в клетках с индуктируемым апоптозом // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 86-88.

Целью работы было определение продукции стабильных метаболитов оксида азота при активации и блокаде опиатных рецепторов в мононуклеарных клетках здоровых доноров при индукции апоптоза и выявление связи с нею активности супероксиддисмутазы. В результате эксперименты сделаны следующие выводы: действие C_6 – церамида на продукцию стабильных метаболитов оксида азота двояко и непосредственно связано с опиатными рецепторами. Эксперимент также показал, что влияние C_6 – церамида на активность СОД в условиях активации опиатных рецепторов тесно связано с продукцией оксида азота, а также C_6 – церамид стимулирует активность СОД и поддерживает ее на высоком уровне в течение всего эксперимента, что позволяет предположить цитопротекторное его действие.

Ключевые слова: оксид азота, апоптоз, опиатные рецепторы, суперокиддисмутаза.

Klimochkina O.M., Sukhostavska N.O. Stable metabolites nitrogen oxides and Superoxide dismutase in conditions of different state of opioid receptors in cells with induced apoptosis // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 86-88.

The aim of the work was to determine the production of stable metabolites of nitric oxide in activation and blockade of opiate receptors in mononuclear cells from healthy donors in apoptosis induction and detection the link with her activities of superoxide dismutase. Experiment also showed that effect of C_6 - ceramide on the production of stable metabolites of nitric oxide doubly and directly related to the opiate receptors; the effect of C_6 - ceramide on the activity of SOD in the activation of opiate receptors are closely associated with the production of nitric oxide. C_6 - ceramide stimulates the activity of SOD and supports it at a high level throughout the experiment. It allows to suggest it's cytoprotective action.

Key words: apoptosis, nitric oxide, opiate receptors, superoxide dismutase.

Надійшла 23.03.2012 р.

Рецензент: проф. І.О.Комаревцева